



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Αναπλ. Καθηγητής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Αναπλ. Καθηγητής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κατακερματισμός DNA και εξωσωματική γονιμοποίηση

Οικονόμου Ιωάννης
Ιατρός,
Ειδικευόμενος Γυναικολογίας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2017

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Νταφόπουλος Κων/νος,
Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ιατρική σχολή
Παν/μιου Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Βαμβακόπουλος Νικόλαος,
Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρική σχολή Παν/μιου Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Ανυφαντής Γεώργιος
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, Ιατρική σχολή Παν/μιου
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Νταφόπουλο Κων/νο για την ανάθεση του θέματος, τις υποδείξεις του και την εν γένει υποστήριξή του, που με βοήθησε να εμβαθύνω στα ζητήματα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και στις μελλοντικές προοπτικές της τεχνητής γονιμοποίησης. Ευχαριστώ και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συμμετοχή και την υποστήριξή τους.

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ
ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΚΑΤΟΧΟΣ ALSO
ΚΑΤΟΧΟΣ ECDL
ΚΑΤΟΧΟΣ PROFICIENCY
ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΟΠΩΣ
ΑΥΤΕΣ ΠΡΟΣΚΟΜΙΣΘΗΣΑΝ

«Κατακερματισμός DNA και εξωσωματική γονιμοποίηση»

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Νταφόπουλος Κων/νος,
Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ιατρική σχολή
Παν/μιου Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Βαμβακόπουλος Νικόλαος,
Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρική σχολή Παν/μιου Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Ανυφαντής Γεώργιος
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας, Ιατρική σχολή Παν/μιου
Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
Summary.....	8
Εισαγωγή.....	9
1.Μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής	10
1.1 Γενικά.....	10
1.2 Ενδομήτρια σπερματέγχυση (IntraUterine Insemination).....	10
1.2 Εξωσωματική γονιμοποίηση.....	11
Διέγερση των ωοθηκών	11
Ωοληψία και γονιμοποίηση των ωαρίων	12
1.3 Εξωσωματική γονιμοποίηση με ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων	13
2. Ο κατακερματισμός του σπερματικού DNA	14
2.1 Ανδρική υπογονιμότητα	14
2.2 Αίτια.....	15
3. Μέθοδοι προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA.....	19
3.1 Άμεσες μέθοδοι.....	20
3.2 Έμμεσες μέθοδοι	22
4. Κλινική σημασία του κατακερματισμού του DNA.....	26
Βιβλιογραφία	34

Περίληψη

Η ραγδαία ανάπτυξη των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει μεταβάλει ριζικά τις παραδοσιακές αντιλήψεις της επιστημονικής κοινότητας για

την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας. Ακόμη και σοβαρότατα αίτια τόσο ανδρικής όσο και γυναικείας υπογονιμότητας μπορούν πλέον να αντιμετωπιστούν. Ο υψηλός βαθμός κατακερματισμού του DNA μπορεί να αποτελεί αιτία ανδρικής υπογονιμότητας που δεν ανιχνεύεται με τον συμβατικό έλεγχο του κλασικού σπερμοδιάγραμματος. Ως κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων νοείται η παρουσία ρηγμάτων στις έλικες του DNA που προκαλεί δομική αστάθεια του γενετικού υλικού. Υπάρχουν ενδείξεις ότι υψηλός βαθμός κατακερματισμού του DNA συσχετίζεται με φτωχή έκβαση κύησης με εξωσωματική γονιμοποίηση, ωστόσο τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν επιτρέπουν ασφαλή συμπεράσματα, ειδικά όταν χρησιμοποιείται η τεχνική ICSI. Ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις δεν έχουν καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα και η ισχύς των τεκμηρίων είναι χαμηλή. Για το λόγο αυτό δε συστήνεται η εξέταση του DNA ως εξέταση ρουτίνας στους υπογόνιμους άνδρες.

Summary

The rapid development of assisted reproductive methods has radically changed the traditional perceptions of the scientific community for the treatment of infertility. Even very serious causes of both male and female infertility can now be treated. The high degree of DNA fragmentation may be a cause of male infertility not detected by conventional control of the classical spermiogram. DNA fragmentation of spermatozoa is defined as the presence of cracks in DNA strands that cause structural instability of the genetic material. There is evidence that a high degree of DNA fragmentation is associated with poor outcome of pregnancy in IVF cases, but the data so far do not allow safe conclusions to be drawn, especially when using the ICSI technique. Reviews and meta-analyses have not resulted in conclusive suggestions and the validity of the evidence is low. For this reason, DNA testing is not recommended as a routine test for infertile men.

Εισαγωγή

Το πρώτο βήμα για την αντιμετώπιση ενός υπογόνιμου ζευγαριού είναι η διάγνωση του αιτίου, με απώτερο στόχο τη γέννηση ενός υγιούς παιδιού. Η εξέλιξη των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση αξιόπιστων προγνωστικών παραγόντων για την πρόβλεψη του αποτελέσματος της διαδικασίας. Η ραγδαία ανάπτυξη των μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει μεταβάλει ριζικά τις παραδοσιακές αντιλήψεις της επιστημονικής κοινότητας για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας. Ακόμη και σοβαρότατα αίτια τόσο ανδρικής όσο και γυναικείας υπογονιμότητας μπορούν πλέον να αντιμετωπιστούν. Ως κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων νοείται η παρουσία ρηγμάτων στις έλικες του DNA που προκαλεί δομική αστάθεια του γενετικού υλικού.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η κατάτμηση του DNA απαιτείται να πραγματοποιηθεί ανάλυση δομής χρωματίνης σπέρματος σε μια μικρή ποσότητα σπερματικού υγρού. Κατά τη δοκιμασία μετρίεται η παρουσία ρηγμάτων της έλικας του DNA, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με ανωμαλία πρωτεϊνών και καθορίζεται το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA καθώς και ο βαθμός της βλάβης του.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι υψηλός βαθμός κατακερματισμού του DNA συσχετίζεται με φτωχή έκβαση κύησης με εξωσωματική γονιμοποίηση, ωστόσο τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν επιτρέπουν ασφαλή συμπεράσματα, ειδικά όταν χρησιμοποιείται η τεχνική ICSI. Ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις δεν έχουν καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα και η ισχύς των τεκμηρίων είναι χαμηλή. Για το λόγο αυτό δε συστήνεται η εξέταση του DNA ως εξέταση ρουτίνας στους υπογόνιμους άνδρες.

1.Μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

1.1 Γενικά

Η πρώτη επιτυχής εργαστηριακή γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά (In Vitro Fertilization – IVF) επιτεύχθηκε το 1978, από τους Steptoe και Edwards (1) Η IVF έχει πλέον καθιερωθεί ως η θεραπευτική προσέγγιση της υπογονιμότητας που οφείλεται σε σαλπινγικό παράγοντα. Η IVF χρησιμοποιείται, επιπλέον, για την αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας σε περιπτώσεις με μέτρια олиγοσπερμία. Όταν η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι κάτω από 5 εκατομμύρια /ml και η κινητικότητα χαμηλή, τα αποτελέσματα είναι πενιχρά. Μια νέα μέθοδος ήρθε να υπερκεράσει τις αδυναμίες της κλασικής IVF, η μέθοδος ICSI (Intracytoplasmic sperm injection), η οποία έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση σοβαρότατων περιστατικών oligo-ασθενο- τερατοσπερμίας. Αυτή η τεχνική αφορά στην άμεση έγχυση ενός σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα ενός ωοκυττάρου, που λαμβάνεται συνήθως από θυλάκια που παράγονται από ελεγχόμενη ωοθηκική διέγερση. Η αποτελεσματικότητα της ICSI έχει αποδειχθεί σε σειρά μελετών (2,3). Με την τεχνική αυτή παρέχεται η δυνατότητα αξιοποίησης σπερματοζωαρίων που απομονώνονται από τους όρχεις και όχι απαραίτητα από την εκσπερμάτιση, όπως σε άνδρες με μωσαϊκό σύνδρομο Klinefelter.

1.2 Ενδομήτρια σπερματέγχυση (IntraUterine Insemination)

Η λιγότερο παρεμβατική μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η ενδομήτρια σπερματέγχυση (Intra-Uterine Insemination - IUI). Η IUI είναι από τις πιο απλές και οικονομικές μεθόδους υποβοήθησης της αναπαραγωγής. Πρόκειται για ελάχιστα παρεμβατική μέθοδο και συνιστά μια από τις πρώτες επιλογές σε περιπτώσεις ήπιας υπογονιμότητας οφειλόμενης στον άνδρα. Συνίσταται στην κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος σπέρματος με σκοπό τον εμπλουτισμό του και, στη συνέχεια, την έγχυση του άμεσα στη μητρική κοιλότητα, χρησιμοποιώντας ένα μικρό καθετήρα διαμέσου του τραχήλου. Στη μέθοδο αυτή, συλλέγεται σπέρμα κατόπιν αυνανισμού στο οποίο γίνεται κατάλληλη επεξεργασία (συνηθίζονται οι μέθοδοι swim-up και Percoll) με ειδικά θρεπτικά υλικά για την αφαίρεση των

προσταγλανδινών και άλλων παραγόντων και με ειδικούς καθετήρες εγχύεται στην ενδομήτρια κοιλότητα. Η έγχυση γίνεται ακριβώς πριν από την ωορρηξία, η οποία προσδιορίζεται ορμονικά και απεικονιστικά. Είναι μέθοδος που ενδείκνυται σε ζευγάρια με ήπια ανδρική υπογονιμότητα, αφού απαιτεί αρκετά καλές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος, οπότε και βελτιώνει τα ποσοστά κύησης σε σύγκριση με την απλή επαφή (4). Το ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου είναι περίπου 6.5%, όταν γίνεται σε φυσικό κύκλο. Αν παράλληλα έχει γίνει και διέγερση ωοθηκών το ποσοστό φτάνει το 9,5%. (5)

1.2 Εξωσωματική γονιμοποίηση

Με τη μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης το ποσοστό επίτευξης εγκυμοσύνης έχει αυξηθεί από 5%-8% τη δεκαετία του 1980 σε >40%, σήμερα.(5) Σε γυναίκες κάτω των 35 το ποσοστό των κύκλων που κατέληγαν σε εγκυμοσύνη ήταν 45,7%, σε γυναίκες ηλικίας 35-37 κατέβαινε στο 37,2%, στις γυναίκες ηλικίας 38-40 κατερχόταν στο 28,1% , ενώ στις γυναίκες 41-42 ετών το ποσοστό ήταν 18,4%. (6) Ενδείξεις για εξωσωματική γονιμοποίηση είναι: Διαταραχές ωοθυλακιωρρηξίας, σαλπινγικός παράγοντας (απόφραξη σαλπίγγων ή δυσλειτουργία), ενδομητρίωση, υπογονιμότητα που οφείλεται σε σοβαρό ανδρικό παράγοντα, ανεξήγητη υπογονιμότητα, ιστορικό αποτυχημένων κύκλων πρόκλησης ωοθυλακιωρρηξίας ή σπερματέγχυσης, όταν συνίσταται προεμφυτική διάγνωση των εμβρύων για γενετικές νόσους. (7) Η εξωσωματική γονιμοποίηση (γονιμοποίηση in vitro IVF) αποτελείται από τρία βήματα: τη διέγερση των ωοθηκών, την ωοληψία τη γονιμοποίηση των ωαρίων και την τοποθέτηση των εμβρύων στη μήτρα (εμβρυομεταφορά).

Διέγερση των ωοθηκών

Η διέγερση των ωοθηκών σκοπό έχει την παραγωγή πολλαπλών ωαρίων. Χορηγούνται γοναδοτροφίνες σε συνδυασμό με GnRH αγωνιστές ή ανταγωνιστές, ανάλογα με το πρωτόκολλο διέγερσης. Πριν από την χορήγηση των φαρμάκων γίνεται υπερηχογραφικός έλεγχος των ωοθηκών για αποκλεισμό ύπαρξης κύστης στις ωοθήκες. Στόχος είναι τα ωοθυλάκια να αυξάνονται καθημερινά το λιγότερο 2mm και τα επίπεδα της οιστραδιόλης να παρουσιάζουν καθημερινή αύξηση >10% σε σχέση με την προηγούμενη ημέρα. Η λήψη των ωαρίων πραγματοποιείται όταν η μεικτή διάμετρος τους είναι μεγαλύτερη των 17mm (κατά προτίμηση τουλάχιστον 3 ωοθυλάκια σε αριθμό). Στην εξωσωματική γονιμοποίηση εφαρμόζεται έντονη φαρμακευτική διέγερση με αποτέλεσμα την ωχρινική ανεπάρκεια. Δηλαδή, το ποσοστό της παραγόμενης προγεστερόνης στο σώμα της γυναίκας δεν είναι αρκετό

για να στηρίξει μία πιθανή εγκυμοσύνη. Έτσι, σε όλα τα πρωτόκολλα εξωσωματικής, όπως και στις σπερματεγχύσεις υπό φαρμακευτική αγωγή, χορηγείται διακολπικά προγεστερόνη μέχρι την επιβεβαίωση της κύησης με τη μέτρηση της β-HCG. (5) Αναφορικά δε με τα ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης, ο μέσος όρος ανά λήψη ωαρίων είναι 29% και στις Ηνωμένες Πολιτείες 31%. Στα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική το ποσοστό επίτευξης εγκυμοσύνης σε γυναίκες έως 28 ετών είναι 50%-54% και κατέρχεται στο 23% σε γυναίκες 40ετών. (5,8)

Ωοληψία και γονιμοποίηση των ωαρίων

Μετά την αναρρόφηση των ωαρίων από τη γυναίκα λαμβάνει χώρα η γονιμοποίηση στο εργαστήριο με σπερματοζωάρια είτε του συντρόφου της, είτε από δότη σπέρματος ανάλογα με την περίπτωση. Η λήψη των ωαρίων διενεργείται υπό αναισθησία και γίνεται με τη βοήθεια κολπικού υπερήχου. Η γονιμοποίηση γίνεται είτε με την κλασσική μέθοδο In Vitro Fertilization (IVF) όπου γίνεται τοποθέτηση των γαμετών σε κοινά τρυβλία και αναμένεται τα σπερματοζωάρια να γονιμοποιήσουν τα ωάρια, είτε με την μικρο-γονιμοποίηση IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI) δηλαδή την ενδοκυτταροπλασματική έγχυση ενός σπερματοζωαρίου σε κάθε ωάριο με σκοπό τη δημιουργία εμβρύων. Στην μέθοδο IVF τα ωάρια που αναρροφώνται τοποθετούνται σε τρυβλία με ειδικό θρεπτικό υλικό, και αφήνονται 4-6 ώρες σε ειδικό κλίβανο καλλιέργειας για να ολοκληρωθούν οι απαραίτητες χημικές μεταβολές και να είναι έτοιμα για τη γονιμοποίηση. Έπειτα 150.000 σπερματοζωάρια περίπου τοποθετούνται σε κάθε τρυβλίο που περιέχει ένα ωάριο. Σε περιπτώσεις oligoασθενοσπερμίας, αζωοσπερμίας (η συλλογή σπέρματος μπορεί να γίνει με τη μέθοδο του αντανισμού ή απευθείας από τους όρχεις ή την επιδιδυμίδα – FNA ή βιοψία όρχεων) με τη βοήθεια ειδικής βελόνης και υπό άμεσο μικροσκοπικό έλεγχο, εισάγεται ένα σπερματοζωάριο στο κυτταρόπλασμα κάθε ωαρίου (ICSI). Στη συνέχεια, τα γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνται σε κλίβανο καλλιέργειας και ελέγχονται μετά από 16-18 ώρες, για την εμφάνιση των δύο προπυρήνων. Η ύπαρξη δύο προπυρήνων δείχνει την επιτυχή γονιμοποίηση του ωαρίου. Γίνεται επανατοποθέτηση των επιτυχώς γονιμοποιημένων ωαρίων σε θρεπτικό υλικό και επανελέγχονται μετά τη γονιμοποίηση, ανάλογα με το πρωτόκολλο εμβρυομεταφοράς το οποίο προσαρμόζεται ξεχωριστά σε κάθε περιστατικό. (5,8) Η τοποθέτηση των δημιουργηθέντων εμβρύων στη μήτρα διενεργείται την 2^η, 3^η, 5^η ή 6^η ημέρα από τη λήψη των ωαρίων, με τη βοήθεια ειδικών καθετήρων εμβρυομεταφοράς στην

ενδομητρική κοιλότητα. Δύο εβδομάδες μετά την εμβρυομεταφορά γίνεται εξέταση αίματος για β-χοριακή γοναδοτροπίνη (β-HCG) προκειμένου να τεκμηριωθεί η εγκυμοσύνη. (5,7)

1.3 Εξωσωματική γονιμοποίηση με ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίων

Η κλασική μέθοδος IVF είναι μια πιο παρεμβατική μέθοδος, ενώ η ICSI είναι τρόπος αντιμετώπισης σοβαρών περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας. Η τεχνική ICSI περιλαμβάνει την επιλογή ενός σπερματοζωαρίου με βάση τη μορφολογία και την κινητικότητά του και την έγχυση αυτού του σπερματοζωαρίου μέσα σε ένα ωάριο. Η όλη διαδικασία γίνεται με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου μεγάλης μεγέθυνσης και ειδικά μικροχειριστήρια. Η τεχνική αυτή έχει δώσει τη λύση σε ζευγάρια όπου υπάρχει έντονος ο ανδρικός παράγοντας υπογονιμότητας. Χρειάζεται μόνο ένα σπερματοζωάριο, ακόμα και χαμηλής κινητικότητας, προκειμένου να επιτευχθεί γονιμοποίηση του ωαρίου. Ωστόσο, το ποσοστό γονιμοποίησης με μικρογονιμοποίηση είναι 55-75%, δηλαδή, ακόμα και με αυτή τη μέθοδο παρατηρείται ένα ποσοστό αποτυχίας γονιμοποίησης, ειδικά αν τα ωάρια είναι χαμηλής ποιότητας, οπότε ο χειρισμός τους για την εφαρμογή της μεθόδου μπορεί να τα επιβαρύνει περαιτέρω ή τα σπερματοζωάρια είναι πολύ χαμηλής ποιότητας σε κινητικότητα και μορφολογία. (9)

2. Ο κατακερματισμός του σπερματικού DNA

2.1 Ανδρική υπογονιμότητα

Τα σπερματοζωάρια, ως φορείς του γενετικού μηνύματος είναι απαραίτητα τόσο στη φυσική, όσο και την υποβοηθούμενη γονιμοποίηση. Το «μήνυμα» περιλαμβάνει το απλοειδές γένωμα, το κεντροσωμάτιο, που είναι απαραίτητο για τη διαίρεση του κυττάρου και σημαντικούς ακόμη παράγοντες για την ανάπτυξη του πλακούντα. Το DNA του σπερματοζωαρίου συνεισφέρει κατά το ήμισυ στο γενετικό υλικό του απογόνου. Συνεπώς, ένα παθολογικό DNA, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του κατακερματισμένου DNA (DNA fragmentation), το οποίο εμφανίζει πολυάριθμες θραύσεις της έλικάς του, μπορεί να εκτροχιάσει την αναπαραγωγική διαδικασία. Εύλογα λοιπόν προβάλλει το ερώτημα αν ο κατακερματισμός του DNA του σπερματοζωαρίου μπορεί να έχει επίπτωση στη γονιμοποίηση, την κυοφορία και τη γέννηση ενός υγιούς παιδιού.

Με τη χρήση διαφορετικών τεχνικών έχει καταδειχθεί ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον κατακερματισμό του DNA των σπερματοζωαρίων ανάμεσα στους γόνιμους και στους υπογόνιμους άνδρες.(10-14) Ωστόσο, η εκτεταμένη αλληλοεπικάλυψη των τιμών ανάμεσα στους γόνιμους και στους υπογόνιμους άνδρες, αλλά και η ασυμφωνία σε ευρέως αποδεκτές τιμές αναφοράς για τη διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων δεν επιτρέπει ασφαλή συμπεράσματα. Ως παράδειγμα, στη μελέτη των Sergerie et al, που έθεσε το 20% ως όριο στην κυτταρομετρική μέθοδο TUNEL για τη διάκριση μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών, με ευαισθησία 96,9% και ειδικότητα 89,4%, η υψηλότερη τιμή κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων στην ομάδα των γόνιμων ήταν 43,8%, ενώ η χαμηλότερη τιμή στην ομάδα των υπογόνιμων ήταν 14,6%.(14)

Πράγματι, η ακεραιότητα του DNA είναι σημαντική για τη φυσιολογική εμβρυολογική ανάπτυξη. Η ακεραιότητα του DNA του σπέρματος διατηρείται εν μέρει με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των πρωταμινών που επιτρέπουν τη συμύκνωση της χρωματίνης στον πυρήνα. Ως «DNA fragmentation» (κατακερματισμός του DNA) αναφέρεται η αλλοίωση ή η καταστροφή του DNA σπέρματος το οποίο δεν είναι δυνατόν να επιδιορθωθεί. Ο βαθμός διάσπασης του DNA στα σπερματοζωάρια μετριέται με την εξέταση DFI (DNA fragmentation index). Σπερματοζωάρια με υψηλό ποσοστό διάσπασης του DNA έχουν μικρότερη

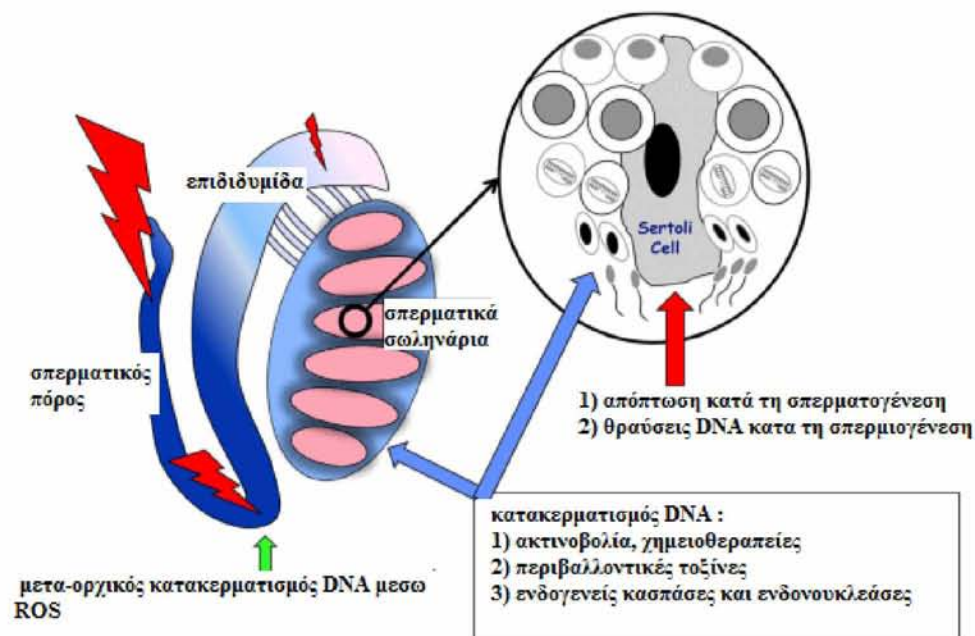
πιθανότητα να δώσουν μια υγιή εγκυμοσύνη. Φαίνεται πως οι άντρες με ποσοστό διάσπασης του DNA μεγαλύτερο από 30% στα σπερματοζωάρια έχουν σημαντικά μειωμένο δυναμικό γονιμότητας (λιγότερες εγκυμοσύνες, διπλάσιες αποβολές). Ενώ λοιπόν στο παρελθόν το «χρυσό πρότυπο» για την αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας ήταν η ανάλυση σπέρματος, σήμερα είναι γνωστό ότι κάποια δείγματα σπέρματος που δείχνουν φυσιολογικά κατά την παραδοσιακή ανάλυση σπέρματος είναι πιθανό να έχουν εκτεταμένη διάσπαση του DNA, γεγονός που προβληματίζει για τις πιθανότητες σύλληψης και ομαλής εξέλιξης της κύησης. (15)

2.2 Αίτια

Ενώ η ακεραιότητα του DNA του σπέρματος είναι ένας από τους σημαντικούς καθοριστικούς παράγοντες της φυσιολογικής γονιμοποίησης και ανάπτυξης εμβρύων, σπέρμα με βλάβη του DNA είναι ικανό να γονιμοποιεί ωάριο. Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί οι μελέτες που αξιολογούν τη σχέση μεταξύ της υψηλής βλάβης του DNA και των ποσοστών εγκυμοσύνης έχουν βρει μόνο μέτρια επίδραση στα ποσοστά σύλληψης με τη συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση και ελάχιστη, αν υπάρχει κάποια, επίδραση με ICSI. Ο κατακερματισμός του DNA ορίζεται ως η παρουσία διπλών ή μονόκλωνων θραυσμάτων που εμφανίζονται στο DNA πριν ή μετά την εκσπερμάτωση. Η ζημία του DNA στο σπέρμα μπορεί να προκληθεί από έξι κύριους μηχανισμούς: (i) απόπτωση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, (ii) θραύσεις των κλώνων κατά τη διάρκεια της χρωματοσκόπησης κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, (iii) ρήγμα στο DNA μετά τους όρχεις που προκαλείται από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κατά τη διάρκεια της διαμετακόμισης του μέσω της αναπαραγωγικής οδού. (iv) κατακερματισμός DNA που επάγεται από ενδογενείς ενδονουκλεάσες, (v) βλάβες DNA προκαλούμενες από ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία και (vi) βλάβες DNA προκαλούμενες από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα και η ατμοσφαιρική ρύπανση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες μέθοδοι βαθμολογούν ένα ποσοστό σπερματοζωαρίων πάνω από ένα συγκεκριμένο ουδό ανίχνευσης, δεν πρόκειται για ένα ποσοστό του DNA που έχει υποστεί βλάβη μέσα σε ένα δεδομένο κύτταρο. Επομένως, σε οποιοδήποτε πληθυσμό σπερματοζωαρίων τα επίπεδα βλάβης του DNA ανά κύτταρο είναι ετερογενή. (16)

Κύριος αιτιολογικός παράγοντας για την βλάβη του DNA είναι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες. Για τον αυξημένο κατακερματισμό του DNA του σπέρματος μπορεί να ευθύνονται τα εξής:

- Λοιμώξεις, φλεγμονές ή υψηλό πυρετός
- Κακή διατροφή
- Χρήση φαρμάκων ή/ και ναρκωτικών
- Κάπνισμα
- Εκθεση σε περιβαλλοντικούς και επαγγελματικούς ρύπους
- Εκθεση σε χημικές/τοξικές ουσίες, ακτινοβολία ή υψηλές θερμοκρασίες
- Μεγάλη ηλικία (>50 ετών)
- Κιρσοκήλη



Εικόνα 1. Αίτια κατακερματισμού DNA και τοπογραφία τους

Η βλάβη του DNA στο σπερματοζωάριο μπορεί να αφορά τόσο το πυρηνικό όσο και το μιτοχονδρικό DNA και μπορεί να προκληθεί είτε κατά την παραγωγή είτε κατά τη μεταφορά των σπερματικών κυττάρων. Φαίνεται ότι πιο σημαντική για την ακεραιότητα του DNA είναι η βλάβη που προκαλείται μετά το επίπεδο των όρχεων, κατά τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από μελέτες που δείχνουν ότι ο κατακερματισμός του DNA είναι υψηλότερος σε σπερματοζωάρια που απομονώνονται από την ουρά της επιδιδυμίδας και από εκσπερμάτιση σε σύγκριση με σπερματοζωάρια που απομονώνονται από τους όρχεις (17-19). Ωστόσο, δεν αποκλείεται διαταραχές στη σπερματογένεση στο επίπεδο των όρχεων να καθιστούν τα σπερματοζωάρια πιο ευάλωτα για βλάβη σε μεταγενέστερο επίπεδο. Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε θραύσεις της DNA έλικας παραμένουν ακόμα ασαφείς. Έχουν προταθεί τρεις βασικές θεωρίες: διαταραχή του μηχανισμού της απόπτωσης, ελαττωματική συμπύκνωση της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, και βλάβη από οξειδωτικό stress.

Η κισσοκήλη θεωρείται η πιο συχνή από τις γνωστές αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας. Έχουν αναφερθεί σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις κατακερματισμού του DNA, προσδιοριζόμενες με ποικίλες τεχνικές, σε άνδρες με κισσοκήλη, ακόμη και με φυσιολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος, σε σύγκριση τόσο με γόνιμους άνδρες (20,21), όσο και με δότες με φυσιολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος (22-24). Σε εφήβους με κισσοκήλη βρέθηκε υψηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό του DNA σε σχέση με υγιή ομάδα ελέγχου της ίδιας ηλικίας, παρότι δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στις κλασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος (157), ενώ καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ του βαθμού της κισσοκήλης και του βαθμού κατακερματισμού του DNA (25). Η διερεύνηση του αποτελέσματος της επέμβασης διόρθωσης της κισσοκήλης στον κατακερματισμό του DNA έδειξε σημαντική ελάττωση στο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμό μετεγχειρητικά (27,7% έναντι 24,6%, $p < 0,05$), χωρίς όμως σημαντική βελτίωση στις κλασικές παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος.

Ορισμένες καταστάσεις έχουν συσχετισθεί με αυξημένο ποσοστό σπερματοζωαρίων με βλάβη στο DNA, αν και οι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί. Το κάπνισμα, εκτός από τις μεταλλαξιογόνες ιδιότητές του, επιδρά αρνητικά και στην ποιότητα του σπέρματος και συγκεκριμένα στον

αριθμό, την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (26,27). Οι καπνιστές παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (28). Έχει αποδειχθεί ότι το σπερματικό DNA των καπνιστών είναι περισσότερο ευάλωτο σε εξωγενείς προσβολές, επειδή η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων στο σπερματικό πλάσμα είναι χαμηλή.

Οι λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος έχει επίσης υποστηριχτεί ότι σχετίζονται με βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων. Υψηλά ποσοστά κατακερματισμένου DNA έχουν βρεθεί σε δείγματα σπέρματος με αυξημένη συγκέντρωση λευκοκυττάρων (29). Αυτό, πιθανότατα, οφείλεται στη δράση μεσολαβητών της φλεγμονής, όπως οι κυτοκίνες (30). Επιπρόσθετα, οι εμπύρετες λοιμώξεις, μπορούν, να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης του σπερματοζωαρίου (31). Ο καρκίνος των όρχεων και η νόσος του Hodgkin, δύο από τις πιο συχνές κακοήθειες νεοπλασίες στους άνδρες αναπαραγωγικής ηλικίας, σχεδόν πάντα επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος και την ακεραιότητα του DNA του σπερματοζωαρίου (32). Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, που συχνά εφαρμόζονται σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι υπεύθυνες για επιπρόσθετη βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων, λόγω της κυτταροτοξικής δράσης στο σπερματικό επιθήλιο. Η αποκατάσταση της σπερματογένεσης μπορεί να συμβεί πολλά έτη μετά τη θεραπεία (33).

Η βλάβη του DNA των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι και ιατρογενής, όπως συμβαίνει σε πρωτόκολλα προετοιμασίας του σπέρματος για υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, κατά τα οποία πραγματοποιείται επανειλημμένη φυγοκέντρωση και απομόνωση σπερματοζωαρίων από το πλούσιο σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες σπερματικό πλάσμα (34). Πρόκειται για μια διαδικασία απαραίτητη, προκειμένου να απομακρυνθούν τα παθολογικά σπερματοζωάρια και να εμπλουτισθεί το σπέρμα.

Η κρυοσυντήρηση και, ιδιαίτερα, η διαδικασία ψύξης - απόψυξης μπορεί επίσης να επηρεάζουν την ακεραιότητα του σπερματικού DNA (35). Γι' αυτό συστήνεται από ορισμένους ερευνητές η προσθήκη αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ακόμη, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως τα εντομοκτόνα και η ατμοσφαιρική ρύπανση με υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA των σπερματοζωαρίων. (36)

3. Μέθοδοι προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA

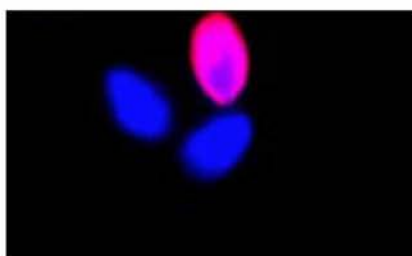
Αναφορικά με τις μεθόδους προσδιορισμού του κατακερματισμού του DNA, σημαντικό είναι το εάν προσδιορίζουν θραύσεις της μονής ή / και της διπλής έλικας του DNA, καθώς, επίσης, το εάν απαιτούν ένα αρχικό προπαρασκευαστικό στάδιο αποδιάταξης (denaturation) του DNA προκειμένου να ανιχνευθούν οι θραύσεις. Οι μέθοδοι προσδιορισμού διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Οι άμεσες ανιχνεύουν τις θραύσεις που ήδη υπάρχουν στο DNA, ενώ οι έμμεσες μέθοδοι προσδιορίζουν ποσοτικά την ευπάθεια του DNA των σπερματοζωαρίων για θραύση. Αυτή μπορεί να προκληθεί από τη δράση εξωγενών παραγόντων, όπως το όξινο ή αλκαλικό pH. Ουσιαστικά στη δεύτερη αυτή περίπτωση γίνεται λόγος για αλκαλεο/οξειδο-δυσμεντικές θέσεις. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες άμεσες μέθοδοι είναι η TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated Nick End Labeling), η COMET (Single Cell Gel Electrophoresis) και η NT (In-Situ Nick Translation). Οι πιο συχνές έμμεσες μέθοδοι είναι η κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», η μικροσκοπική μέθοδος της χρωστικής «πορτοκαλί της ακριδίνης» (AO), η DBDFISH (DNA Break Detection - Fluorescence In Situ Hybridization) και η SCD (Sperm Chromatin Dispersion).

Αντίστοιχη μελέτη έδειξε ότι το 84% των ζευγαριών που πέτυχαν σύλληψη μέσα στους τρεις πρώτους μήνες ελεύθερων επαφών εμφάνιζε $DFI \leq 15\%$, ενώ όλα τα ζευγάρια με $DFI \geq 30\%$ πέτυχαν κύηση μόνο μετά τους τρεις πρώτους μήνες ή δεν πέτυχαν καθόλου κύηση στο τέλος της δωδεκάμηνης περιόδου παρακολούθησης. (37) Το DFI ήταν σημαντικά υψηλότερο στα ζευγάρια που πέτυχαν σύλληψη μετά τους τρεις πρώτους μήνες ή δεν πέτυχαν καθόλου σύλληψη, σε σύγκριση με τα ζευγάρια που πέτυχαν σύλληψη εντός των τριών πρώτων μηνών. Το όριο του 30% για το DFI αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως το φαινόμενο της «κορυφής του παγόβουνου». Σύμφωνα με αυτό, εάν το 30% των σπερματοζωαρίων αναγνωρίζονται ως παθολογικά, πιθανολογούνται βλάβες του DNA και στον υπόλοιπο πληθυσμό των σπερματοζωαρίων. Αυτές είναι δύσκολα ανιχνεύσιμες με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα. Το DFI ταξινομείται στις εξής τέσσερις κατηγορίες (προσδιορισμός με κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης»: άριστο ($< 15\%$), καλό ($15 - 24\%$), ικανοποιητικό ($25 - 30\%$) και φτωχό ($> 30\%$) (38).

3.1 Άμεσες μέθοδοι

Μέθοδος TUNEL

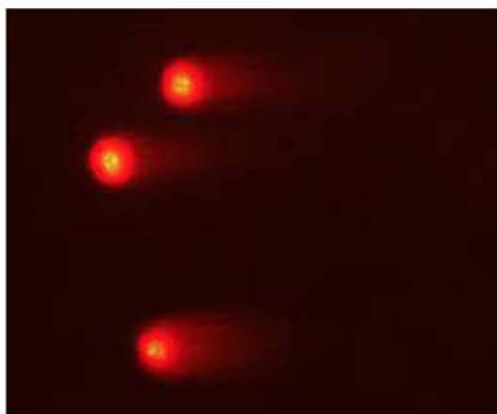
Η μέθοδος TUNEL είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για την άμεση ανίχνευση θραύσεων της έλικας του DNA, χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερα εξειδικευμένα τεχνικά μέσα. Κατά τη μέθοδο αυτή νουκλεοτιδια τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (deoxyuridine triphosphate – dUTP) ενσωματώνονται σε ρήγματα μονής και διπλής έλικας, σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο τελική δεοξυ-νουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση (terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT). Τα νουκλεοτίδια DUTP είναι σεσημασμένα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των σπερματοζωαρίων που περιέχουν κατακερματισμένο DNA με μικροσκόπιο φθορισμού, με οπτικό μικροσκόπιο ή με κυτταρομετρία ροής. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό (%) των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA. Αν και το αποτέλεσμα της μεθόδου θεωρείται αντιπροσωπευτικό της απόπτωσης, η μέθοδος προσδιορίζει τον κατακερματισμό του DNA, που μπορεί να προκληθεί και με άλλους μηχανισμούς (πχ επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας). Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται η ανίχνευση των πραγματικών θραύσεων του DNA, ο σχετικά προσιτός από οικονομική άποψη σε σύγκριση με άλλες μεθόδους εξοπλισμός, καθώς και το ότι η μικροσκοπική μέθοδος μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και εάν ανευρίσκονται ελάχιστα σπερματοζωάρια στην εκσπερμάτιση. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το γεγονός ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικά τεχνικά πρωτόκολλα στα διάφορα εργαστήρια και συνεπώς απουσιάζουν αξιόπιστες τιμές αναφοράς. Αποτέλεσμα να μην έχουν ακόμα καθιερωθεί αξιόπιστες τιμές αναφοράς. Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι οι αντικειμενοφόρες πλάκες αποχρωματίζονται γρήγορα, περιορίζοντας σημαντικά το χρόνο εξέτασης, άρα και το χρόνο που είναι διαθέσιμος για την ανίχνευσης και μέτρηση των σπερματοζωαρίων. Για το σκοπό αυτό, η μέθοδος έχει τροποποιηθεί με τη χρήση ενός συστήματος που παράγει έντονο σήμα από τα χρωμογόνα υποστρώματα. Αυτό το σύστημα σήμανσης βασίζεται στην καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης και παρέχει τον απαιτούμενο χρόνο για να μετρηθούν περισσότερα σπερματοζωάρια, οπότε αυξάνεται η ακρίβεια της μεθόδου.(39-41)



Εικόνα 2. Μέθοδος TUNEL με μικροσκόπιο φθορισμού. Απεικονίζονται 2 σπερματοζώαρια με ακέραιο DNA και με κόκκινο ένα σπερματοζώαριο με κατακερματισμένο DNA.

Μέθοδος COMET

Στη μέθοδο COMET, τα σπερματοζώαρια τοποθετούνται σε λεπτή στιβάδα αгарόξης σε πλάκα μικροσκοπίου και υφίστανται λύση, ηλεκτροφόρηση και χρώση με φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται με το DNA. Με αυτόν τον τρόπο, το κατακερματισμένο DNA, που έχει μικρότερο μοριακό βάρος, οδεύει προς την άνοδο, ενώ το ακέραιο, μη κατακερματισμένο DNA παραμένει στην κεφαλή του «κομήτη». Συνεπώς, τα σπερματοζώαρια με υψηλό ποσοστό κατακερματισμού του DNA παρουσιάζουν «ουρά κομήτη», με μεγαλύτερο μήκος και μεγαλύτερη ένταση φθορισμού. Η μέθοδος απαιτεί τη χρησιμοποίηση μικροσκοπίου φθορισμού και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ποσοστό σπερματοζωαρίων με «μακριά ουρά». Υπάρχουν δύο είδη της μεθόδου COMET, η αλκαλική και η ουδέτερη. Η αλκαλική μέθοδος πραγματοποιείται σε αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 10$), με αποτέλεσμα το DNA των σπερματοζωαρίων να υφίσταται αποδιάταξη και να αναγνωρίζονται ρήγματα, τόσο της μονής όσο και της διπλής έλικας DNA, με τον κίνδυνο να υπερεκτιμηθεί ο αριθμός των θραύσεων του DNA εξαιτίας της μετατροπής αλκαλεο-δεσμευτικών θέσεων (alkali-labile sites) σε θραύσεις, χαρακτηριστικό που προσιδιάζει σε έμμεση μέθοδο. Η ουδέτερη μέθοδος ($\text{pH} < 9$) προσδιορίζει μόνο τις θραύσεις στη διπλή έλικα, αφού οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται δεν προκαλούν αποδιάταξη του DNA (140). Αυτό σημαίνει ότι η ουδέτερη μέθοδος, πιθανότατα, αναγνωρίζει θραύσεις με μεγαλύτερη κλινική σημασία. Γενικά, πάντως, η μέθοδος COMET είναι μια απαιτητική και χρονοβόρα δοκιμασία με μεγάλη διακύμανση μεταξύ των μετρήσεων (inter-assay variability), γεγονός που την καθιστά δύσκολα εφαρμόσιμη στην κλινική πράξη. (43,44)



Εικόνα 3. Μέθοδος COMET. Τα σπερματοζώαρια με κατακερματισμό του DNA παρουσιάζουν μακρύτερη και εντονότερα φθορίζουσα «ουρά κομήτη».

Μέθοδος NT

Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει ποσοτικά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων τριφωσφορικής δεοξυουριδίνης dUTPs σε θραύσεις μονής έλικας, με μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση I. Απαραίτητη είναι η χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Η παράμετρος που προσδιορίζεται είναι το ποσοστό σπερματοζωαρίων με ενσωματωμένα dUTPs. Αν και η τεχνική είναι απλή, η μέθοδος NT είναι λιγότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, ενώ ακόμη δεν έχουν καθιερωθεί τιμές αναφοράς (43).

3.2 Έμμεσες μέθοδοι

1.Κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης»

Η μέθοδος αυτή (Flow cytometric acridine orange assay, Sperm Chromatin Structure Assay-SCSA) αξιολογεί την ευπάθεια της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων για κατακερματισμό μετά την επίδραση ήπιου οξέος. Βασίζεται στις μεταχρωματικές ιδιότητες της χρωστικής «πορτοκαλί της ακριδίνης». Αυτή, όταν συνδέεται με δίκλωνο έλικα DNA εκπέμπει πράσινο φθορισμό, ενώ όταν συνδέεται με μονόκλωνο DNA κόκκινο. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το DFI (DNA Fragmentation Index), που εκφράζει την αναλογία «κόκκινος» / («κόκκινος» + «πράσινος») φθορισμός και αντιπροσωπεύει το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με κατακερματισμένο DNA.

Επίσης, μία άλλη παράμετρος που προσδιορίζεται είναι το HDS (High DNA Stainability), δηλαδή το ποσοστό των σπερματοζωαρίων με έντονη χρώση του DNA,

που αντιστοιχεί σε ανώριμες μορφές με ανεπαρκή συμπύκνωση της χρωματίνης. Η κυτταρομετρία ροής δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης 5.000 – 10.000 σπερματοζωαρίων μέσα σε λίγα λεπτά και έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα όσον αφορά το φθορισμό, καθώς χρησιμοποιεί 1024 χρωματικά κανάλια (38). Συνεπώς, η μέθοδος αυτή είναι πιο αντικειμενική συγκριτικά με το ανθρώπινο μάτι και παρουσιάζει υψηλή επαναληψιμότητα. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγεται η δυνατότητα χρησιμοποίησης τόσο νωπών όσο και κατεψυγμένων δειγμάτων. Πρόκειται για μια τυποποιημένη τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες (43). Ωστόσο, θεωρείται μειονέκτημα της μεθόδου ωστόσο είναι το γεγονός ότι δεν ανιχνεύει πραγματικές θραύσεις, αλλά αλκαλεο/οξεδεσμευτικές θέσεις. Επιπλέον η εφαρμογή της στα ανδρολογικά εργαστήρια είναι περιορισμένη, κυρίως εξαιτίας του ακριβού εξοπλισμού και του λογισμικού που απαιτείται, αλλά και επειδή τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεαστούν ακόμα και από μικρές μεταβολές των συνθηκών πραγματοποίησής της (44). Επίσης, υπάρχει δυσκολία στο να προσδιοριστούν ορισμένα δείγματα λόγω του πολύ μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων (< 10.000 / ml) ή της παρουσίας μεγάλης ποσότητας κυτταρικών υπολειμμάτων (debris) (38).

Μικροσκοπική μέθοδος της χρωστικής πορτοκαλί της ακριδίνης (ΑΟ)

Η μικροσκοπική μέθοδος ΑΟ είναι μια απλοποιημένη παραλλαγή της κυτταρομετρικής τεχνικής (45). Προσδιορίζει την ευπάθεια της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων για θραύση, με την *in situ* επίδραση οξέος. Υπολογίζει την μεταχρωματική αλλαγή του φθορισμού της χρωστικής από πράσινο (φυσιολογικό DNA) σε κόκκινο (κατακερματισμένο DNA). Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε ποσοστό σπερματοζωαρίων με κόκκινο φθορισμό. Αν και πρόκειται για μια απλή τεχνική με προσιτό εξοπλισμό, έχει κάποια μειονεκτήματα. Υπάρχουν δυσκολίες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων εξαιτίας του ασαφούς χρώματος, της ετερογενούς χρώσης των αντικειμενοφόρων πλακών και του γρήγορου αποχρωματισμού (38), γεγονός που απαιτεί την αξιολόγηση των πλακών αμέσως μετά τη χρώση. Επίσης, επειδή το πορτοκαλί της ακριδίνης απορροφάται από το γυαλί, και οι αντικειμενοφόρες πλάκες και οι καλυπτρίδες δεν είναι τελείως επίπεδες, είναι πιθανόν οι κατά τόπους υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις της χρωστικής να δώσουν ψευδή αποτελέσματα (38).

Μέθοδος DBD-FISH

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την *in situ* ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό θραύσεων του DNA σε ολόκληρο το γένωμα ή εντός περιοχών του DNA με συγκεκριμένη αλληλουχία (46). Τα σπερματοζωάρια απογυμνώνονται από τις πρωτεΐνες, υφίστανται αφυδάτωση και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ένα αλκαλικό διάλυμα που προκαλεί αποδιάταξη του κατακερματισμένου DNA. Ακολούθως τα δείγματα επωάζονται με DNA ανιχνευτές (probes), που υβριδοποιούνται με τις θέσεις μονόκλωνου DNA και παράγουν ένα σήμα. Η ποσότητα του φθορισμού είναι ανάλογη με τον βαθμό κατακερματισμού του DNA. Η μέθοδος DBD-FISH μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και στην περίπτωση μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων. Ωστόσο, δεν χρησιμοποιείται συχνά και τα κλινικά δεδομένα είναι περιορισμένα.(44).

Μέθοδος SCD

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή ότι, μετά την επίδραση οξέος που προκαλεί αποδιάταξη του DNA των σπερματοζωαρίων και την απομάκρυνση των πυρηνικών πρωτεϊνών, εφόσον υπάρχουν θραύσεις σε αυτό, δεν σχηματίζεται η χαρακτηριστική άλως που παρατηρείται όταν το DNA είναι φυσιολογικό (11). Όταν σπερματοζωάρια χωρίς κατακερματισμένο DNA τοποθετούνται σε πηκτή αгарόζης και υφίστανται την επίδραση λυτικού διαλύματος, οι πυρήνες εμφανίζουν άλω αποτελούμενη από το DNA που έχει αποδιαταχθεί. Οι πυρήνες που έχουν υποστεί αυτήν την επεξεργασία λέγονται «πυρηνοειδή» (nucleoids). Αν το DNA είναι κατακερματισμένο, η άλως δεν μπορεί να σχηματιστεί ή είναι πολύ μικρή. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως ποσοστό των σπερματοζωαρίων με πολύ μικρή ή καθόλου άλω. Η παρατήρηση γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού ή φωτεινού πεδίου. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, η δοκιμασία SCD δεν στηρίζεται στον καθορισμό της έντασης του χρώματος ή του φθορισμού. Είναι μια σχετικά απλή τεχνική, αλλά τα διαθέσιμα κλινικά δεδομένα είναι ακόμα περιορισμένα.

Φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθόδων της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης», της TUNEL και της SCD. Και οι τρεις μέθοδοι παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά στην εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA. Αντίθετα, η μικροσκοπική μέθοδος AO μάλλον υπερτιμά τον κατακερματισμό, σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους (47). Ανεξάρτητα από την τεχνική προσδιορισμού, όλες οι μέθοδοι ανιχνεύουν τον κατακερματισμό του DNA στο σύνολο του γονιδιώματος,

είτε, δηλαδή, εντοπίζεται σε εξόνια, που είναι περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είτε σε ιντρόνια, που είναι «σιωπηλές» περιοχές του γενώματος. Τα ιντρόνια αποτελούν το 90% του DNA. Είναι προφανές ότι θραύσεις σε θέσεις γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αναμένεται να είναι περισσότερο επιβλαβείς, σε σχέση με αυτές που εντοπίζονται σε «σιωπηλές» περιοχές (44). Ωστόσο, τυχόν βλάβη ακόμη και σε αυτές τις περιοχές θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την αρχιτεκτονική του DNA.

4. Κλινική σημασία του κατακερματισμού του DNA

Το θεωρητικό υπόβαθρο για τον κατακερματισμό του DNA επιτρέπει την υπόθεση για την επίπτωσή του στις πιθανότητες σύλληψης, τόσο με φυσιολογικό τρόπο όσο και με τις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, αλλά και οι πιθανές μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και κατ' επέκταση στο νεογνο και την εν γένει ανάπτυξη του παιδιού. Η ακεραιότητα του DNA του σπέρματος θεωρείται ζωτικής σημασίας για την κανονική γονιμοποίηση, την ανάπτυξη εμβρύου και για επιτυχημένη εμφύτευση και εγκυμοσύνη τόσο στη φυσική όσο και στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Παρόλο που μερικές μελέτες έχουν βρει κάποια αξία στη χρήση των τεστ DNA του σπέρματος στην αξιολόγηση της ανδρικής υπογονιμότητας, η προγνωστική αξία της ανίχνευσης του DNA του σπέρματος για την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή παραμένει αβέβαιη.

Φυσιολογική σύλληψη

Μια προοπτική μελέτη σχετικά με την επίδραση του κατακερματισμού του DNA (όπως αυτό προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης») σε ζευγάρια άγνωστης γονιμότητας τα οποία επιθυμούσαν πρώτη κύηση έδειξε ότι η γονιμοποιητική ικανότητα παρουσίαζε σημαντική ελάττωση όταν το DFI ήταν μεγαλύτερο από 20% και ήταν ιδιαίτερα μικρή για DFI μεγαλύτερο από 40% (12).

Ακόμα και όταν όλοι οι συγχυτικοί παράγοντες λαμβάνονταν υπόψη (στατιστική διόρθωση για τα πιθανά αίτια υπογονιμότητας της γυναίκας) το DFI συνέχιζε να παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με τη γονιμοποιητική ικανότητα, ενώ αποτέλεσε και προγνωστικό δείκτη της γονιμοποιητικής ικανότητας, ανεξάρτητα από τον αριθμό των σπερματοζωαρίων.

Ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων μελετάται πλέον εντατικά, ως ένα πολλά υποσχόμενος προγνωστικός παράγοντας για την πιθανότητα κύησης μετά από κλασική IVF και ICSI. Ωστόσο, δεν υπάρχουν οριστικά αποτελέσματα για τη χρησιμότητά του ως δείκτη πρόγνωσης της κύησης, ούτε συστήματα η συστηματική χρήση στα υπογόνιμα ζευγάρια. Αν και κάποιες μελέτες κατά το παρελθόν υποστήριζαν ότι είναι απίθανο να επιτευχθεί κύηση με υψηλό επίπεδο κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων και μάλιστα προτάθηκαν

όρια πάνω από τα οποία δεν μπορούσε να υπάρξει κύηση (12), μεταγενέστερες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα, καθώς έγινε δυνατή η επίτευξη κύησης με IVF ή / και ICSI σε επίπεδα τιμών DFI αρκετά υψηλότερα από 27% (48,49). Αν και υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA έχουν πράγματι συσχετιστεί με χαμηλότερα ποσοστά κύησης μετά από κλασική IVF και ICSI (50-52), οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση των επιπέδων του κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων με το ποσοστό γονιμοποίησης, ιδιαίτερα στην κλασική IVF, αλλά όχι με το ποσοστό κύησης ή γέννησης (48,49). Επιπλέον οι Payne et al (48) ανέφεραν το αναπάντεχο εύρημα ότι άνδρες με χαμηλό ποσοστό κατακερματισμού ($DFI \leq 9\%$) ήταν λιγότερο πιθανό να πετύχουν κύηση. Φαίνεται ότι η ακεραιότητα του DNA των σπερματοζωαρίων έχει ιδιαίτερη σημασία όταν η γονιμοποίηση πραγματοποιείται κάτω από περισσότερο «φυσιολογικές συνθήκες», όπως η κλασική IVF. Στο πλαίσιο αυτό, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων της ICSI και της IVF για $DFI \leq 27\%$ ή $\leq 30\%$. (15) Ωστόσο, όταν το επίπεδο κατακερματισμού του DNA είναι υψηλό (πχ $DFI > 27\%$ ή 30%), τα αποτελέσματα της ICSI υπερέχουν σαφώς εκείνων της κλασικής IVF.

Υψηλό επίπεδο κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα ποσοστά κυήσεων και γεννήσεων με IUI (15). Όταν χρησιμοποιείται είτε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης» είτε η μέθοδος TUNEL, φαίνεται ότι ο βαθμός του κατακερματισμού του DNA σε δείγματα που οδήγησαν σε κύηση υπολείπεται σημαντικά των ατελέσφορων δειγμάτων.(53) Το όριο κατακερματισμού, πέραν του οποίου δεν επιτυγχάνονται κυήσεις προσδιορίζεται στο 12% (53), ενώ μια άρτια μεθοδολογικά μελέτη τοποθετεί τον πήχη του δείκτη DFI για την πιθανότητα κύησης και γέννησης σημαντικά υψηλότερα, στο 27%, όπως αυτός προσδιορίζεται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής με τη χρωστική «πορτοκαλί της ακριδίνης». Παρόλα αυτά, όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες με και χωρίς κλινική κύηση ή γέννηση, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά το DFI. (54) Οι ερευνητές κατέληξαν ότι για ποσοστό κλινικών κυήσεων 20% η θετική προγνωστική αξία (Positive Predictive Value - PPV) ήταν 97% και η αρνητική προγνωστική τιμή (Negative Predictive Value - NPV) 24%. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα κύησης τοποθετείται στο 3% σε περίπτωση παθολογικού DFI και στο 24% σε περίπτωση φυσιολογικού DFI. Επειδή όμως η ευαισθησία της μεθόδου είναι πολύ χαμηλή

(20%), που πρακτικά σημαίνει αποτυχία πρόβλεψης κύησης στο 80% των περιπτώσεων, η κλινική της σημασία περιορίζεται σημαντικά. Για το λόγο αυτό σε ζευγάρια με υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA των σπερματοζωαρίων προτείνεται η εφαρμογή των μεθόδων IVF ή ICSI παρά IUI. (44) Ωστόσο, η ευαισθησία της μεθόδου ήταν μόνο 20,7% (δηλαδή, αποτυχία να προβλεφθεί η επίτευξη κύησης στο 80% των περιπτώσεων), περιορίζοντας σημαντικά την κλινική της σημασία.

Φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση, αν και ασθενής, μεταξύ των κλασικών παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος και του βαθμού κατακερματισμού του DNA. Σε μερικές μελέτες, δε βρέθηκε καμία συσχέτιση, οδηγώντας έτσι στην υπόθεση ότι ο κατακερματισμός του DNA των σπερματοζωαρίων θα μπορούσε να είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της ανδρικής γονιμότητας. Έχει αναφερθεί αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό κατακερματισμού του DNA και στον αριθμό των σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα, τη μορφολογία και, ιδιαίτερα, τη μορφολογία της κεφαλής (159-162). Αν και συνήθως βρίσκεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και του αριθμού των σπερματοζωαρίων, σε μια μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση, εύρημα που ενισχύει τη θεωρία της αποτυχημένης απόπτωσης αναφορικά με την αιτιολογία του κατακερματισμού του DNA. (55) Χρειάζονται επανειλημμένες μετρήσεις, προκειμένου να αποσαφηνιστεί το ποσοστό του κατακερματισμένου DNA, καθώς έχει βρεθεί ότι το ένα τρίτο περίπου των ανδρών με $DFI > 30\%$ κατά την πρώτη μέτρηση είχε $DFI < 30\%$ κατά τη δεύτερη, ενώ το ίδιο ποσοστό ανδρών με DFI μεταξύ 21 και 30% κατά την πρώτη μέτρηση είχε $DFI > 30\%$ κατά τη δεύτερη. (56) Σημειώνεται επίσης ότι οι τιμές κατακερματισμού του DNA που προσδιορίζονται με διαφορετικές τεχνικές δεν είναι συγκρίσιμες, ενώ δεν μπορούν επίσης να συγκριθούν τιμές που λαμβάνονται από διαφορετικά εργαστήρια, ακόμη κι αν χρησιμοποιούν την ίδια τεχνική, καθώς πολλοί εργαστηριακοί παράγοντες και διαφοροποιήσεις στο πρωτόκολλο εφαρμογής μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα. (57)

Μελέτες έχουν εξετάσει τη δυνατότητα γονιμότητας των δοτών σπέρματος ενώ άλλες έχουν συγκρίνει τον κατακερματισμό του DNA μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών. Γενικά, διαπιστώνεται μια συσχέτιση ανάμεσα στον αυξημένο κατακερματισμό του DNA και τη μειωμένη γονιμότητα. Ωστόσο, ο αριθμός των μελετών είναι περιορισμένος και τα στοιχεία στις διαθέσιμες χαρακτηρίζονται επιπέδου B και C. Η προγνωστική αξία αυτών των εξετάσεων εξαρτάται από τον

επιπολασμό των μη φυσιολογικών δοκιμασιών στον πληθυσμό και δεν έχει τεκμηριωθεί ποιος πρέπει να είναι ο κατάλληλος πληθυσμός για έλεγχο. Συμπερασματικά, υπάρχουν στοιχεία (επίπεδο B) που δείχνουν ότι ο κατακερματισμός του DNA σχετίζεται με μειωμένη γονιμότητα. Ωστόσο, δεν επαρκούν (Επίπεδο C) για να δικαιολογήσουν τη χρησιμοποίηση τη δοκιμασίας ως δείκτη πρόβλεψης της γονιμότητας, δεδομένου ότι δεν έχουν τεκμηριωθεί προβλεπόμενες οριακές τιμές (cut-off values). Ως προς το ερώτημα αν η δοκιμασία ακεραιότητας του DNA προβλέπει την εγκυμοσύνη με ενδομήτριο σπερματέγχυση (IUI), σημειώνεται ότι πολλές μελέτες το διερεύνησαν με τις δοκιμασίες SCD, SCSA και την TUNEL. (58-60)

Μια μελέτη επιπέδου II-1 (61) έδειξε μια θετική προγνωστική αξία της δοκιμής SCSA με δείκτη κατακερματισμού DNA (DFI) > 30% που σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης και γέννησης. Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν αυτό το όριο για την IUI, ενώ σε μια άλλη μελέτη δε βρέθηκε καμία συσχέτιση με την ακεραιότητα του DNA και την εγκυμοσύνη. Συμπερασματικά, δεν υπάρχουν επαρκή αποδεικτικά στοιχεία (Επίπεδο C) για να προταθεί η χρήση εξετάσεων ακεραιότητας DNA για την πρόβλεψη της εγκυμοσύνης με την IUI. Αναφορικά με το ερώτημα αν είναι ο κατακερματισμός του DNA προγνωστικό της εγκυμοσύνης με in vitro γονιμοποίηση (IVF), μια εκτεταμένη ανασκόπηση των μελετών που αναλύουν την επίδραση του κατακερματισμού του DNA στην εγκυμοσύνη με IVF δείχνει ότι η όποια επίδραση είναι ασθενής. Μια μετα-ανάλυση (62) ωστόσο έδειξε ότι ο κατακερματισμός του DNA ήταν που σχετίζεται με μια μέτρια, αλλά σημαντική, μείωση των ποσοστών της εξωσωματικής γονιμοποίησης (PPV=77%, NPV 34%). Άλλες σχετικές μελέτες περιελάμβαναν περιορισμένους αριθμούς ατόμων ή δεν συμπεριέλαβε ομάδες ελέγχου (63) Συμπερασματικά, δεν υπάρχουν επαρκή αποδεικτικά στοιχεία (επίπεδο C) που να συνιστούν τη συνήθη χρήση της δοκιμής ακεραιότητας του DNA για ασθενείς που υποβάλλονται σε IVF.

Στο ερώτημα αν είναι ο κατακερματισμός του DNA πρόδρομος της εγκυμοσύνης με την εξωσωματική γονιμοποίηση και την εξωσωματική γονιμοποίηση ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI), μια ανασκόπηση των μελετών που εξετάζουν την επίδραση του κατακερματισμού του DNA σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε IVF/ICSI δείχνει ότι ο κατακερματισμός του DNA συσχετίζεται ασθενώς με την εγκυμοσύνη σε κύκλους IVF/ICSI, ενώ δεν υπάρχουν σαφή cut-off

όρια. Σε μια πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση τα ποσοστά κύησης βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα της δοκιμής ακεραιότητας του DNA. Συμπερασματικά, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία (Επίπεδο C) για να συστήσει κανείς τη δοκιμασία ακεραιότητας του DNA ως ρουτίνα, προκειμένου για τη δοκιμασία IVF / ICSI. Στο ερώτημα αν είναι ο κατακερματισμός του DNA προγνωστικός αποβολής, λίγες μελέτες έχουν εξετάσει το συγκεκριμένο ζήτημα και σε μια μετα-ανάλυση(64) βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του κατακερματισμού του DNA και των αποβολών μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση ή ICSI. Ωστόσο, και σε αυτήν την περίπτωση δεν υπάρχουν επαρκή αποδεικτικά στοιχεία (Επίπεδο C) για να προταθεί η δοκιμή ακεραιότητας του DNA ως ρουτίνα για την πρόβλεψη ενδεχόμενης αποβολής.(63)

Η μετα-ανάλυση των Li et al. (65) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η βλάβη του DNA του σπέρματος είναι επιβλαβής για τα ποσοστά κλινικής εγκυμοσύνης στην εξωσωματική γονιμοποίηση, αλλά όχι και με την τεχνική ICSI. Μια άλλη μετα-ανάλυση (66) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η αξιολόγηση της βλάβης του DNA του σπέρματος δεν είναι αρκετά ισχυρή ώστε να παρέχει οποιοδήποτε κλινικό πλεονέκτημα αυτών των αναλύσεων για την αξιολόγηση των στείρων ανδρών. Η Επιτροπή Πρακτικής της Αμερικανικής Εταιρείας για την Αναπαραγωγική Ιατρική (63) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα υπάρχοντα δεδομένα δεν υποστηρίζουν την επιβλαβή επίδραση του κατακερματισμένου DNA στην έκβαση της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αντίθετα, η μετα-ανάλυση από τους Zini et al.(64) δείχνει το αρνητικό αποτέλεσμα της βλάβης του DNA του σπέρματος επί της έκβασης της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και παρέχει μια κλινική ένδειξη για την αξιολόγηση της βλάβης του DNA πριν από την εξωσωματική γονιμοποίηση ή την ICSI και μια λογική για περαιτέρω διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της βλάβης του DNA του σπέρματος και των αποβολών. Οι δοκιμασίες ανίχνευσης βλάβης του DNA του σπέρματος θα πρέπει να συνιστώνται στην αντιμετώπιση της επαναλαμβανόμενης αποτυχίας στην επίτευξη εγκυμοσύνης. Η έλλειψη συμφωνίας στη βιβλιογραφία οφείλεται εν μέρει στην ποικιλομορφία των μεθόδων δοκιμής DNA του σπέρματος, στην έλλειψη τυποποιημένων πρωτοκόλλων, στη χρήση ευρέος φάσματος οριακών τιμών και, σε κάποιο βαθμό, η περιορισμένη κατανόηση του τι ακριβώς μετρά καθεμία από τις δοκιμασίες DNA του σπέρματος.(67)

Στην ανασκόπηση των Simon et al (67) εντοπίστηκαν 56 μελέτες που αφορούσαν 8068 κύκλους θεραπείας (IVF και / ή ICSI), οι οποίες περιλαμβάνουν 16

μελέτες IVF (3734 κύκλοι θεραπείας), 24 μελέτες ICSI (2282 κύκλοι θεραπείας) και 16 μικτές μελέτες IVF + ICSI (2052 κύκλοι θεραπείας) . Από τους συνολικούς κύκλους θεραπείας ($n = 8068$), η βλάβη του σπέρματος DNA μετρήθηκε με SCSA σε 2813 κύκλους (34,9%), SCD σε 2359 κύκλους (29,2%), TUNEL σε 2098 κύκλους (26,0%) και κύκλους Comet σε 798 . Διαπιστώθηκε μια συνολική επιβλαβή επίδραση της βλάβης του σπερματικού DNA σε κλινικό ποσοστό εγκυμοσύνης μετά από IVF ή / και ICSI (56 IVF, ICSI ή μικτές μελέτες IVF + ICSI) με λόγο πιθανοτήτων (odds ratio) 1,68 (95% CI : 1,49-1,89). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις προηγούμενες μετα-αναλύσεις^{13,14} και την έκθεση της Επιτροπής Πρακτικής της Αμερικανικής Εταιρείας για την Αναπαραγωγική Ιατρική¹⁵, όπου δεν είχε αποδειχθεί αρνητικό αποτέλεσμα της βλάβης του DNA του σπέρματος στην κλινική έκβαση της εγκυμοσύνης. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μετα-αναλύσεις, όπου η πλειονότητα των μελετών αξιολόγησαν τη βλάβη του DNA του σπέρματος με δοκιμασίες SCSA και TUNEL, στην ως άνω ανασκόπηση συμπεριλήφθηκαν πιο πρόσφατες μελέτες με αξιολόγηση της βλάβης του DNA από σπέρμα με ανάλυση SCD και Comet. Όταν διαχωρίστηκε το σύνολο δεδομένων σύμφωνα με την χρησιμοποιούμενη δοκιμασία προσδιορισμού του κατακερματισμένου DNA, όλες εκτός από τις μελέτες με SCSA, έδειξαν επιζήμια επίδραση της βλάβης του σπέρματος στην κλινική εγκυμοσύνη (μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και / ή ICSI). Το σύνολο δεδομένων των μελετών SCSA (23 μελέτες περιλαμβανομένων των 2813 κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής) δεν έδειξε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της βλάβης του σπέρματος και της κλινικής εγκυμοσύνης. Αυτό είναι σε αντίθεση με μια προηγούμενη μετα-ανάλυση³⁶ όπου η βλάβη του DNA του σπέρματος που αξιολογήθηκε από την SCSA συνδέθηκε θετικά με την IUI και την IVF.

Παρατηρείται ότι οι μελέτες που χρησιμοποιούν τις δοκιμασίες SCSA και SCD έδειξαν επιβλαβή επίδραση του κατακερματισμού του DNA στην κλινική εγκυμοσύνη με την μεικτή ομάδα θεραπείας μόνο (μικτές μελέτες IVF + ICSI). Αντίθετα, μια ανάλυση των μελετών που έκαναν χρήση της δοκιμασίας TUNEL κατέδειξε την αρνητική επίδραση της βλάβης του σπερματικού DNA στην κλινική εγκυμοσύνη και με τις τρεις ομάδες θεραπείας (IVF, ICSI και μικτές μελέτες IVF + ICSI), υποδεικνύοντας ότι η άμεση μέθοδος μέτρησης βλάβης του DNA μπορεί να είναι καλύτερη στην πρόβλεψη της έκβασης της εγκυμοσύνης. (68) Η ανάλυση των 16 μελετών IVF (με διάμεσο ποσοστό εγκυμοσύνης 32%) αποκάλυψε μια μέση τιμή PPV 79% και μέση τιμή NPV 35%. Έτσι, σε πληθυσμούς με συνολικό ποσοστό

εγκυμοσύνης εξωσωματικής γονιμοποίησης 32%, η αξιολόγηση της βλάβης του σπέρματος μπορεί να κάνει διακρίσεις μεταξύ του ποσοστού της εγκυμοσύνης στην εξωσωματική γονιμοποίηση (21%) και του 35% (αρνητική εξέταση). Μια ανάλυση των 24 μελετών ICSI (με διάμεσο ποσοστό εγκυμοσύνης 36%) αποκάλυψε ένα διάμεση τιμή PPV 64% και μέσο όρο NPV 40%. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να δίδεται προσοχή κατά την εκτίμηση της προβλεπτικής αξίας των τεστ DNA του σπέρματος στο πλαίσιο της συμβατικής εξωσωματικής γονιμοποίησης και / ή του ICSI, διότι αυτές οι εκτιμήσεις προέρχονται από σχετικά μικρές μελέτες (100-200 κύκλοι), τα χαρακτηριστικά της μελέτης είναι ετερογενή (π.χ. διαφορετικοί τύποι προσδιορισμού, επίπεδα ουδού DNA του σπέρματος και κλινικές παράμετροι) και η ακρίβεια των διαφόρων προσδιορισμών DNA του σπέρματος είναι αμφιλεγόμενη. Επιπλέον, η περιορισμένη αντίληψή μας για την υποκείμενη φύση της βλάβης του DNA του σπέρματος έχει επίσης περιορίσει την ευρεία αποδοχή αυτών των αναλύσεων. (69) Μέχρι σήμερα, αρκετές αναφορές έχουν διαπιστώσει ότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να καταδεικνύουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ βλαβών DNA και τα αναπαραγωγικά αποτελέσματα μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και / ή ICSI.

Κλινική σημασία του κατακερματισμού του mtDNA

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν είναι τα εργοστάσια ενέργειας του κυττάρου διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στη σπερματογένεση και στη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων μπορεί να οδηγήσει σε μερική ή πλήρη διακοπή της σπερματογένεσης και, συνεπώς, σε υπογονιμότητα. (70-72) Μεταλλάξεις του mtDNA μπορεί να επηρεάσουν τη φυσιολογική διαφοροποίηση των μιτοχονδρίων και τη χωροθέτησή τους, που φυσιολογικά γίνεται στο μέσο τμήμα των σπερματοζωαρίων. Επειδή τα μιτοχόνδρια παρέχουν το απαραίτητο ATP για την κίνηση της ουράς των σπερματοζωαρίων, βλάβη του DNA τους μπορεί να επηρεάσει την κινητικότητα, ακόμα και να οδηγήσει σε παθολογικές μορφές σπερματοζωαρίων. (73)

Συμπερασματικά, τα μέχρι σήμερα δεδομένα προβληματίζουν σχετικά με το ποσοστό κατακερματισμού DNA που θέτουν σε διακύβευση την κύηση, ενώ η μέθοδος ICSI φαίνεται να ενδείκνυται στις περιπτώσεις με υψηλό ποσοστό κατακερματισμένου DNA. Σε κάθε περίπτωση, προς το παρόν, καμία μέθοδος δεν μπορεί να προσδιορίσει αυτόν τον παράγοντα, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να υπάρξει διαφοροποίηση μεταξύ του κατακερματισμού με ή χωρίς κλινική σημασία.

Ωστόσο, το μόνο που έχει πραγματικά σημασία είναι η κατάσταση του DNA του μοναδικού αυτού σπερματοζωαρίου που θα γονιμοποιήσει το ωάριο. Τόσο κατά τη γονιμοποίηση με φυσικό τρόπο όσο και κατά την εφαρμογή μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής δεν αποκλείεται να επιλεγθεί ένα φυσιολογικό σπερματοζωάριο, ακόμη κι εάν το ποσοστό κατακερματισμού του DNA του συνολικού πληθυσμού των σπερματοζωαρίων είναι υψηλό. Το ζήτημα του προσδιορισμού της έκτασης της βλάβης στο συγκεκριμένο σπερματοζωάριο, χωρίς αυτό να καταστραφεί, είναι μια πρόκληση για το μέλλον, όπως και η ανάπτυξη τεχνικών διαχωρισμού του σπέρματος, με απομάκρυνση των προβληματικών σπερματοζωαρίων, ώστε η επιλογή να γίνεται μεταξύ των φυσιολογικών.

Βιβλιογραφία

1. Steptoe PC, Edwards RG. 1978 Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
2. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18.
4. Snick HK, Collins JA, Evers JL. What is the most valid comparison treatment in trials of intrauterine insemination, timed or uninfluenced intercourse? A systematic review and meta-analysis of indirect evidence. *Hum Reprod* 2008; 23: 2239-45.
5. Ρούσσος Χ. Δαβίδ. Μαιευτική και Γυναικολογία, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Τζιόλα, 2015; 23-35.
6. Corda L, Khanapure A, Karoshi M. A textbook of preconceptional medicine and management Biopanic, advanced maternal age and fertility outcomes England Publisher: Wetheral: Sapiens, c2012.
7. <http://www.aretaiio-obgyn.com/el/departments/assisted-reproduction/155.html>
[7/10/167](#)
8. Βουλγαρίδης Γ. Η αναπαραγωγή. Εκδόσεις Παρισσιανού, 2002; 7-23.
9. Mantikou E Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013; 19: 210-20.
10. Dorostghoal M, Kazeminejad SR, Shahbazian N, Pourmehdi M, Jabbari A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia*. 2017 (in press)
11. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24: 59-66.
12. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73: 43-50.

13. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20: 3446-51.
14. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-7.
15. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007; 22: 174-9.
16. Bounartzi T, Dafopoulos K, Anifandis G, Messini CI, Koutsonikou C, Kouris S, Satra M, Sotiriou S, Vamvakopoulos N, Messinis IE. Pregnancy prediction by free sperm DNA and sperm DNA fragmentation in semen specimens of IVF/ICSI-ET patients. *Hum Fertil (Camb)* 2016; 19: 56-62.
17. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20: 226-30.
18. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1912-21.
19. Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich ML. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20: 3101-8.
20. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosálvez J. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 2006; 27: 106-11.
21. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80: 1431-6.
22. Chen CH, Lee SS, Chen DC, Chien HH, Chen IC, Chu YN, Liu JY, Chen WH, Wu GJ. Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 2004; 25: 348-53.

23. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006; 21: 986-93.
24. Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH, Chen IC. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril* 2009; 91: 831-7.
25. Bertolla RP, Cedenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril* 2006; 85: 625-8.
26. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003; 79: 287-91.
27. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995; 154: 1030-4.
28. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423: 103-11.
29. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Jr., Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002; 78: 319-29.
30. Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, Kril I, Kurpysz M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent Eur J Immunol*. 2015; 40: 337-44.
31. Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000; 21: 739-46.
32. O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum Reprod* 2008; 23: 1044-52.
33. Fossa SD, De AP, Kraggerud SM, Evenson D, Theodorsen L, Clausen OP. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry* 1997; 30: 192-6.
34. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-45.

35. Kalthur G, Adiga SK, Upadhy D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril* 2008; 89: 1723-7.
36. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005; 20: 2776-83.
37. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de AP, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-49.
38. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
39. Andrabi SM. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 561-9.
40. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 53: 1945-51.
41. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998; 52: 252-8.
42. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996; 363: 89-96.
43. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8: 11-29.
44. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009; 30: 219-29.
45. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87-91.
46. Fernandez JL, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, Gosalvez J. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82: 251-6.

47. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27: 53-9.
48. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2005; 84: 356-64.
49. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 2006; 21: 1576-82.
50. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006; 21: 2876-81.
51. Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81: 965-72.
52. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1289-95.
53. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002; 17: 3122-8.
54. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19: 1401-8.
55. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 2002; 17: 1266-73.
56. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 1597-605.

57. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Christensen P. Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human semen. *J Androl* 2005; 26: 360-8.
58. Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Repro BiomedOnline* 2006; 12: 466-72.
59. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl* 2010; 33: e221-7.
60. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems biology in reproductive medicine* 2011; 57: 133-8.
61. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19: 1401-8.
62. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Systems Biology in reproductive medicine* 2011; 57: 78-85.
63. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril*. 2013; 99: 673-7.
64. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23: 2663-8.
65. Li L, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23: 367-76.
66. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823-31.
67. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*. 2017; 19: 80-90.
68. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, et al. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 2010; 76: 1380-6.

69. Beshay VE, Bukulmez O. Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012; 24: 172–9.
70. Frank SA, Hurst LD. Mitochondria and male disease. *Nature* 1996; 383: 224.
71. Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 345-62.
72. St. John JC, Cooke ID, Barratt CLR. Mitochondrial mutations and male infertility. *Nat Med* 1997; 3: 124-5.
73. Shamsi MB, Kumar R, Bhatt A, Bamezai RN, Kumar R, Gupta NP, Das TK, Dada R. Mitochondrial DNA mutation in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J Urol* 2008; 24: 150-4.